

**METHODISCHE PROBLEME DER GETRENNTEN
BESTIMMUNG VON TRIJODTHYRONIN
UND THYROXIN IM SERUM**

Hans Borowzak

1974
—

AUS DER II.MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. E. BUCHBORN

METHODISCHE PROBLEME DER GETRENNTEN BESTIMMUNG VON
TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN IM SERUM

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN
VORGELEGT

von Hans Borowzak
aus
Schellweiler



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 19.2.1974

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Mein Dank gilt besonders

Herrn Prof. Dr. med. P.C.SCRIBA für die Überlassung des Themas, für seine andauernde Unterstützung und Beratung,

Herrn Dr. med. K.HORN für seine tatkräftige Hilfe durch Diskussion, Kritik und Anregungen,

Frau Priv. Doz. Dr. med. C.R.PICKARDT für ihre Beratung bei der Abfassung des klinischen Teils dieser Arbeit,

Frau F.HAAG für die Unterstützung bei der Anfertigung der Abbildungen, allen Mitarbeitern des Labors 174 der II. Medizinischen Universitätsklinik München, insbesondere meinem Mitdoktoranden Jürgen HABERMANN.

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

$T_3^{-127}J$	Trijodthyronin- ^{127}J od (stabiles Nuklid)
$T_4^{-127}J$	Thyroxin- ^{127}J od (stabiles Nuklid)
$T_3^{-125}J$	Trijodthyronin- ^{125}J od (instabiles Nuklid)
$T_4^{-125}J$	Thyroxin- ^{125}J od (instabiles Nuklid)
T_3	Trijodthyronin
T_4	Thyroxin
MIT	Monojodtyrosin
DIT	Dijodtyrosin
TBG	Thyroxin-bindendes-Globulin
TBA	Thyroxin-bindendes-Albumin
TBPA	Thyroxin-bindendes-Präalbumin
TSH	Thyreotropin
TRH	"Thyreotropin releasing factor"
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
$PB^{127}I$	Proteingebundenes ^{127}J od
mCi, μ Ci	Milli-Curie, Mikro-Curie
V	Volumen
T	Temperatur
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
IPM	Impulse pro Minute
E	Extinktion
T	Transmission
CPBA	Competitive Proteinbindungsanalyse
RIA	Radioimmunologische Analyse

Inhalt

Seite

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2.</u>	<u>MESSUNG DES TRIJODTHYRONINSPIEGELS</u> <u>IM SERUM</u>	<u>3</u>
<u>2.1</u>	<u>Methodik</u>	<u>3</u>
<u>2.1.1</u>	<u>Reagenzien</u>	<u>3</u>
2.1.1.1	¹²⁵ Jodaminosäuren (radioaktive Verbindungen)	3
2.1.1.2	¹²⁷ Jodaminosäuren (stabile Verbindungen)	3
2.1.1.3	Kaliumjodideichstandards	3
2.1.1.4	0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3	3
2.1.1.5	Kupferaktivierter Zinkstaub	4
2.1.1.6	Reagenzien für die Mikrojodbestimmung	4
<u>2.1.2</u>	<u>Präparation der Säulen</u>	<u>5</u>
2.1.2.1	Kationenaustauscher AG 50 W X-4 minus 400 mesh, H ⁺ -Form	5
2.1.2.2	Kationenaustauscher SP Sephadex C-25, Na ⁺ -Form	5
2.1.2.3	Sephadex G-25 superfine	5
2.1.2.4	Sephadex LH-20	6
<u>2.1.3</u>	<u>Methodische Vorversuche</u>	<u>7</u>
2.1.3.1	Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum	7
2.1.3.1.1	Prinzip der Kationenaustausch- chromatographie	7
2.1.3.1.2	Durchführung der T ₃ - und T ₄ -Extraktion aus dem Serum	9
2.1.3.1.3	Ergebnisse der T ₃ - und T ₄ -Extraktion aus dem Serum	10

		Seite
2.1.3.2	Trennung von T ₃ und T ₄ auf Sephadex G-25 superfine	15
2.1.3.2.1	Durchführung	16
2.1.3.2.2	Ergebnisse	16
2.1.3.2.2.1	Elutionspuffer	17
2.1.3.2.2.2	Pumpgeschwindigkeit	17
2.1.3.2.2.3	Gelmenge	20
2.1.3.2.2.4	Temperatur	20
2.1.3.3	Konzentrierung der T ₃ -Peaks	20
2.1.3.3.1	Durchführung	21
2.1.3.3.2	Ergebnisse	21
2.1.3.3.2.1	Sephadex LH-20	21
2.1.3.3.2.2	SP Sephadex C-25	22
2.1.3.4	Einengen der Eluate von den Konzentriersäulen	22
2.1.3.4.1	Einengen im offenen System	22
2.1.3.4.2	Einengen im geschlossenen System	23
2.1.3.5	Dejodierung der Jodaminosäuren	25
2.1.3.5.1	Durchführung	25
2.1.3.5.2	Ergebnisse	26
2.1.3.6	Automatisierte Jodbestimmung	28
2.1.3.6.1	Durchführung	28
2.1.3.6.2	Ergebnisse	29
2.1.4	Abtrennung des T ₃ vom T ₄ aus dem Serum im geschlossenen säulenchromatographi- schen System mit anschließendem chemi- schen Jodnachweis	31
2.1.4.1	Durchführung	31
2.1.4.2	Auswertung	35
2.2	Ergebnisse der T ₃ -Bestimmung im Serum	36
2.2.1	Statistische Qualitätskontrolle	36
2.2.1.1	Wiederfinderaten von T ₃ - ¹²⁵ J-Standards	36

	Seite
2.2.1.2 Wiederfinderaten von T_3 - ^{127}J -Standards	36
2.2.1.3 Spezifität	36
2.2.1.4 Normalbereich	37
2.2.2 Diskussion der Nachteile der Methode	38
2.2.3 Klinische Ergebnisse	41
<u>3. ZUSAMMENFASSUNG</u>	45
<u>4. LITERATUR</u>	46

1. EINLEITUNG

In der Laboratoriumsdiagnostik von Schilddrüsenfunktionsstörungen haben sich in den letzten Jahren die Bestimmung des proteingebundenen Jods (PB^{127}I) oder besser des spezifischen Gesamtthyroxins mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse in Verbindung mit einem T_3 -in vitro-Test bewährt. Dabei ergibt sich bei etwa 95 % der Hyperthyreosen eine gute Übereinstimmung zwischen den Laborwerten und dem klinischen Bild (1,2). Dagegen zeigen die restlichen 5 % eine Diskrepanz zwischen einer klinisch hyperthyreoten Stoffwechsellage und den Normalbefunden dieser konventionellen Schilddrüsendiagnostik. Als Ursache wird bei einem Teil dieser Patienten eine sogenannte T_3 -Hyperthyreose diskutiert, die definiert ist durch eine hyperthyreote Stoffwechsellage infolge isolierter T_3 -Mehrsekretion bei normalem Serum- T_4 -Spiegel und normalem TBG-Gehalt, der indirekt anhand eines T_3 -in vitro-Testes beurteilt werden kann (3).

In den letzten Jahren wurde in unserem Laboratorium eine Methode zur getrennten Bestimmung der beiden Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) im Serum entwickelt: Extraktion aus dem Serum und Trennung von T_3 und T_4 erfolgt in einem geschlossenen säulenchromatographischen System. Die Hormonspiegel werden anschließend mit einer chemischen Jodanalyse gemessen. Unser Ziel war es nun, diese bestehende Methode durch weitere Automatisierung zu vereinfachen, besser zu standardisieren und zeitlich zu verkürzen, um nach Krankheitsbildern mit gestörter Relation der T_3 - zu T_4 -Sekretion zu suchen. Zwar sind in der Literatur weniger aufwendige Methoden beschrieben, wie z.B. radioimmunologische Bestimmungsverfahren (4 - 12), aber uns stan-

den erstens keine T_3 -Antikörper zur Verfügung und zweitens ist die Messung im Radioimmunoassay noch problematisch wegen der Störung durch spezifisch bindende Proteine, vorwiegend des Thyroxin-bindenden-Globulins (TBG) und wegen der Kreuzimmunität der T_3 -Antikörper mit T_4 . Diese Schwierigkeiten sind auch aus den stark differierenden Normalbereichen ersichtlich (4 - 24), so daß die Messung der T_3 -Spiegel nach Extraktion aus dem Serum und nachfolgender Abtrennung des T_3 vom T_4 noch von Interesse ist.

2. MESSUNG DES TRIJODTHYRONINSPIEGELS IM SERUM

2.1 Methodik

2.1.1 Reagenzien

2.1.1.1 ^{125}J odaminosäuren (radioaktive Verbindungen)

0,2 mCi L-Trijodthyronin- ^{125}J od bzw. L-Thyroxin- ^{125}J od (in ca. 1 ml wässriger Propylen-Glykol-Lösung, T_3 - bzw. T_4 -Gehalt ca. 1 - 5 μg , Radiochemical Centre, Amersham/England) wurden mit sterilem 0,055 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, der 2,5 g Rinderalbumin (Pentex^R, Fa. Roth, Karlsruhe) enthielt, auf ein Volumen von 1000 ml gebracht und in Bleimänteln im Kühlraum (+ 4°C) aufbewahrt.

2.1.1.2 ^{127}J odaminosäuren (stabile Verbindungen)

L-Trijodthyronin- ^{127}J od bzw. L-Thyroxin- ^{127}J od (Fa. Fluka AG, Buchs/Schweiz) wurden jeweils in einer kleinen Menge 1 N NaOH gelöst und, wenn nicht anders beschrieben, so weiterverdünnt, daß die Eichstandards von 0 - 10 ng T_3 -J/ml bzw. 0 - 200 ng T_4 -J/ml in 0,005 N NaOH vorlagen.

2.1.1.3 Kaliumjodideichstandards

Kaliumjodid puriss. (Fa. Fluka AG, Buchs/Schweiz) wurde in ca. 10 ml aqua bidest. gelöst und mit 1 N NaOH auf die Endverdünnung von 0 - 10 ng J^- /ml gebracht.

2.1.1.4 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3

22,8 g di-Kaliumhydrogenphosphat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) p.a. (Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 2000 ml aqua bidest. gelöst und mit 304 ml 0,1 N KOH versetzt. Der pH wurde mit

einem pH-Meter überprüft. Die Angabe der Molarität bezieht sich auf das Molekulargewicht des di-Kaliumhydrogenphosphat (25).

2.1.1.5 Kupferaktivierter Zinkstaub (35)

1 g Zinkstaub p.a. (Fa. Merck, Darmstadt) wurde mit 25 ml 4%-igem Kupfer(II)-sulfat in einem verschlossenen Reagenzglas ca. 2 Minuten kräftig geschüttelt. Im Anschluß daran wurde der Zinkstaub auf einer Nutsche mit ca. 1000 ml aqua bidest. gründlich gewaschen. Während des Waschvorgangs darf der Zinkstaub zu keinem Zeitpunkt trocken werden.

2.1.1.6 Reagenzien für die Mikrojodbestimmung

0,2 M Arsenige Säure

9,892 g di-Arsentrioxid (As_2O_3) und 7,0 g Natriumhydroxid-Plättchen wurden in ca. 200 ml aqua bidest. gelöst und danach auf 800 ml aufgefüllt. Nach vorsichtiger Zugabe von 97,2 ml konz. Schwefelsäure wurde wieder mit aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und schließlich 0,25 ml Brij^R (Fa. Technicon, Frankfurt) als Netzmittel zugegeben.

0,05 M Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung

6,326 Ammoniumcer(IV)-sulfat wurden in ca. 100 ml aqua bidest. gelöst und vorsichtig mit 20 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Anschließend wurde mit aqua bidest. auf 200 ml aufgefüllt.

Säuregemisch

Das Säuregemisch bestand aus 40 ml 60%-iger Perchlorsäure, 100 ml 65%-iger Salpetersäure und 860 ml 0,1 N HCl.

2.1.2 Präparation der Säulen

2.1.2.1 Kationenaustauscher AG 50 W X-4 minus 400 mesh, H^+ -Form (BIO-Rad Laboratories, Richmond/USA)

Dieser Austauscher wurde in einem Überschuß von 0,1 N HCl aufgeschüttelt. Nach Sedimentation und Dekantieren des Überstandes wurde dieser Waschvorgang zweimal wiederholt. Schließlich wurde die Austauschersuspension in eine 5 ml-Einmal-Plastikspritze (Fa. Braun, Melsungen) je nach benötigter Austauschermenge gegeben. Vor den zentralen Auslauf der Spritze wurde zuvor ein feinporiges Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen) gelegt.

2.1.2.2 Kationenaustauscher SP Sephadex C-25, Na^+ -Form (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden)

Dieses Austauschergel wurde über Nacht in aqua bidest. gequellt und danach dreimal in 0,5 N HCl ausgeschüttelt. Der gleiche Vorgang wurde ebenfalls dreimal mit 0,1 N HCl durchgeführt. Anschließend wurden die Säulen wie oben (s. 2.1.2.1) beschrieben gefüllt.

2.1.2.3 Sephadex G-25 superfine (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden)

3 g Sephadex G-25 superfine wurden in aqua bidest. über Nacht gequellt und danach in eine 10 ml-Einmal-Plastikspritze (Fa. Terumo, über Fa. Sartorius, Göttingen), vor deren zentralen Auslauf wieder ein feinporiges Membranfilter lag, gefüllt.

2.1.2.4 Sephadex LH-20

(Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden)

Dieses Gel wurde in der gleichen Weise wie das Sephadex G-25 superfine in aqua bidest. gequellt und danach in 2 ml-Plastik-Einmalspritzen (Fa. Braun, Messungen) gefüllt.

2.1.3 Methodische Vorversuche

2.1.3.1 Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum

Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) sind im Serum zu über 99% an Trägerproteine gebunden und zwar an das Thyroxin-bindende-Globulin (TBG), Thyroxin-bindende-Albumin (TBA) und Thyroxin-bindende-Präalbumin (TBPA) (26 - 30). Vor der chromatographischen Trennung von T_3 und T_4 ist eine quantitative Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum notwendig, wobei keine chemischen und physikalischen Veränderungen vorkommen dürfen. Hierzu haben sich in unserem Labor schon früher die sauren Kationenaustauscher AG 50 W X-4 minus 400 mesh und SP Sephadex C-25 am besten geeignet gezeigt (20, 21, 32).

2.1.3.1.1 Prinzip der Kationenaustauschchromatographie (31)

Kationenaustauscher bestehen aus einem unlöslichen hochmolekularen Gerüst (Matrix), das aus Kunstharz, Silikaten oder wie im Fall des SP Sephadex C-25 aus Polysacchariden bestehen kann. An diese Matrix sind die sogenannten Ankergruppen fest und chemisch gebunden. Sie werden auch als Festionen bezeichnet und bestehen je nach Art des Austauschers aus phenolischen Hydroxyl-, Carboxyl- oder Sulfonsäuregruppen. An diesen Festionen sind die austauschbaren Gegenionen, z.B. Na^+ -, K^+ -, H^+ -Ionen gebunden. Die Matrix des stark sauren Kationenaustauschers AG 50 W X-4 minus 400 mesh besteht aus einem Polymerisationsharz und die Festionen aus Sulfonsäuregruppen. Durch die Bezeichnung "X-4" ist

der Grad der Quervernetzung festgelegt, d.h. daß in diesem Falle der Austauscher zu 4% aus quervernetzten Substanzen besteht. Die Angabe "minus 400 mesh" bezieht sich auf den Durchmesser der Austauscherkugeln, der hier 0,04 mm beträgt ($16/\text{mesh} \hat{=} \text{Korndurchmesser in mm}$).

Der ebenfalls stark saure Kationenaustauscher SP Sephadex C-25 wurde auf der Basis des Dextrangels Sephadex G-25 hergestellt und zwar durch Einführung von Sulfoäthylgruppen in das Dextranmolekül (33).

Der Vorgang der Isolierung der Schilddrüsenhormone von den Serumproteinen auf Kationenaustauschersäulen und die nachfolgende Elution von T_3 und T_4 besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Schritt:

Die Schilddrüsenhormone werden im sauren Milieu reversibel an den Austauscher gebunden, während die Trägerproteine und das anorganische Jodid eluiert werden.

2. Schritt:

Wegen der großen Kapazität der Austauschergruppen werden die H^+ -Gegenionen mit einem Überschuß eines Kaliumsalzes ausgetauscht und dadurch der Austauscher in die K^+ -Form gebracht.

3. Schritt:

Im basischen Milieu können durch Nachwaschen mit einer Lösung mit einem pH über 11 die Schilddrüsenhormone in einem schmalen Gipfel von der Austauschersäule eluiert werden.

Ob es sich bei der Bindung der Schilddrüsenhormone im sauren Milieu bzw. bei der Ablösung im alkalischen Milieu um einen Ionenaustausch oder nur um eine unspe-

zifische Adsorption an den Austauscher handelt, konnte von uns nicht mit Sicherheit geklärt werden.

2.1.3.1.2 Durchführung der T_3 - und T_4 -Extraktion aus dem Serum

Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Inkubationsgemisch von 2,5 ml eines gepoolten Humanserums mit jeweils 0,2 ml T_3 - ^{125}J bzw. 0,2 ml T_4 - ^{125}J verwendet und 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Diese Zeit reicht nach früheren Erfahrungen zur Äquilibration zwischen endogenem und zugesetztem radioaktiven Hormon einerseits und den Serumproteinen andererseits aus (34). Zur Kontrolle der vollständigen Extraktion wurden die radioaktiven Standardlösungen T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J ohne vorherige Seruminkubation chromatographiert. Hierbei wurden statt Serum 2,5 ml einer Polypeptidlösung (Haemacel^R, Behring-Werke, Marburg/Lahn) zugegeben, da sonst T_3 und T_4 zu einem großen Prozentsatz an Glas und Plastik adsorbiert werden.

Die 5 ml-Säulen mit den verschiedenen Ionenaustauschermengen (s. 2.1.2.1 und 2.1.2.2) wurden in einem Thermost block temperaturkonstant gehalten.

Durch Einsatz einer 25-Kanal-Peristaltik-Pumpe (Firma Ismatec, Zürich/Schweiz) konnte gleichzeitig zeitgesteuert die Chromatographie über bis zu 25 Säulen erfolgen. Die Pumpvolumina konnten erstens durch die Verwendung verschiedener Durchmesser der Proportionierschläuche und zweitens durch die Wahl unter 10 verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten variiert werden.

Nach ca. 15 Minuten Vorspülen der Ionenaustauschersäulen mit 0,1 N HCl wurden die Inkubationsgemische quantitativ angesaugt und durch anschließendes Nachwaschen mit 0,1 N HCl für 10 Minuten die Serumproteine und

Tracerverunreinigungen eluiert. Danach wurden die H^+ -Gegenionen des Austauschers durch Nachwaschen mit einer 1 M Kaliumchlorid- oder einer 1 M Kaliumacetatlösung gegen K^+ -Ionen ausgetauscht. Der vollständige Austausch der Gegenionen zeigte sich anhand des pH-Umschlags des Säulen-Eluats von pH 1 auf ca. pH 7. Jetzt konnten die Schilddrüsenhormone mit einer Lösung mit einem pH-Wert über 11 in einem schmalen Peak von der Austauschersäule eluiert werden. Die Eluate wurden zeitgesteuert in kleinen Fraktionen mit einem automatischen Fraktionssammler (Linear II, Fa. Serva, Heidelberg) gesammelt und an einem Gammameßplatz (Gammaguard, Fa. Tracerlab, Köln) gemessen.

2.1.3.1.3 Ergebnisse der T_3 - und T_4 -Extraktion aus dem Serum

1. Schritt.

Wie Abbildung 1 zeigt, konnte durch Steigerung der AG 50 - Ionenaustauschermenge über 3 ml keine signifikant höhere Extraktion des T_3 aus dem Serum erzielt werden. Gleiche Extraktionsraten wurden bei Verwendung von 5 ml SP Sephadex C-25 erreicht, das später wegen der Schwierigkeiten mit einer neuen Charge AG 50 verwendet wurde (s.u.). Während bei 1 und 2 ml AG 50 die Extraktionsrate durch Steigerung der Temperatur verbessert werden konnte, zeigte sich bei Austauschermengen von über 3 ml AG 50 kein signifikanter Effekt mehr. Bei der Radioaktivität im Proteinpeak von ca. 4% handelte es sich jeweils sicher um Tracerverunreinigungen, z.B. $^{125}Jodid$, die mit zunehmendem Alter der T_3 - ^{125}J -Lösungen anstiegen. Bei der Rechromatographie des "Proteinpeaks" über eine zweite 4 ml - AG 50-Säule wurde nämlich wieder alle Aktivität mit den Proteinen eluiert,

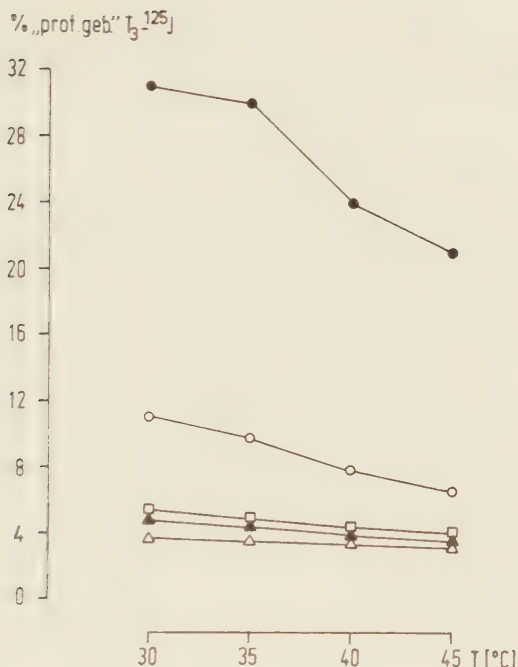


Abb.1: Einfluß von Temperatur und Ionenaustauschermenge auf die Extraktionsrate von $T_3-^{125}J$ aus dem Serum

Aufgezeichnet ist jeweils die Radioaktivität des $T_3-^{125}J$ -Tracers im Proteinpeak in Prozent der Gesamtaktivität (Ordinate) in Abhängigkeit von der Temperatur (Abszisse) bei Verwendung verschiedener Austauschermengen von AG 50 W X-4 minus 400 mesh, 1 ml (●—●), 2 ml (○—○), 3 ml (▲—▲), 4 ml (△—△) und 5 ml SP Sephadex C-25 (□—□).
Durchflußrate: 0,125 ml/min
Erklärung s. Text (2.1.3.1.2)

während bei Rechromatographie des T_3 -Peaks, der wiederum mit Serum inkubiert wurde, keine Aktivität mehr im Proteinpeak nachgewiesen werden konnte.

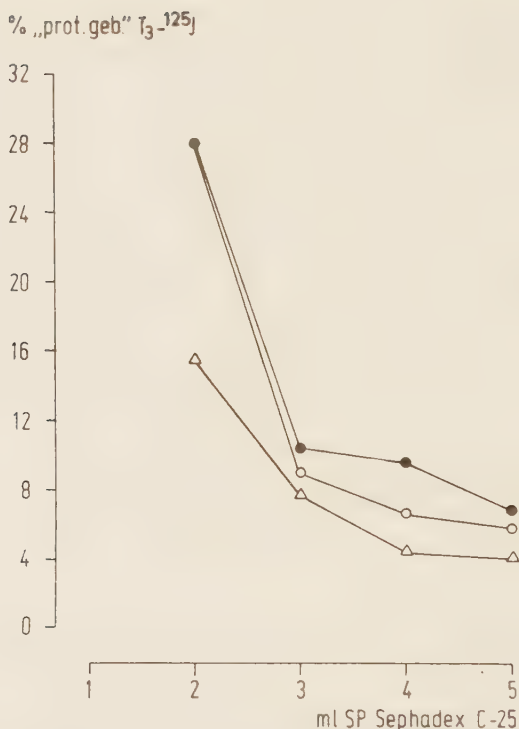


Abb.2: Einfluß von Ionenaustauschermenge und Serummenge auf die Extraktionsrate von T₃-¹²⁵J aus dem Serum

Aufgezeichnet ist jeweils die Radioaktivität des T₃-¹²⁵J-Tracers im Proteinpeak in Prozent der Gesamtaktivität (Ordinate) in Abhängigkeit von der Ionenaustauschermenge SP Sephadex C-25 (Abszisse) bei Verwendung von 2ml (Δ—Δ), 3 ml (○—○) und 4 ml Serum (●—●).
 Zimmertemperatur, Durchflußrate: 0,125 ml/min
 Erklärung s. Text (2.1.3.1.2)

Aus Abbildung 2 ersieht man, daß auf einer Austauschersäule mit 5 ml SP Sephadex C-25 bis zu 4 ml Serum quantitativ von T₃ und T₄ befreit werden können. Verlangsa-

mung der Durchflußrate unter 0,125 ml/min erbrachte keine Verbesserung, ebenso wenig wie eine Ansäuerung oder Alkalisierung des Inkubationsgemisches.

2. Schritt:

Prinzipiell konnten zum Gegenionenaustausch von H^+ zu K^+ sowohl 1 M Kaliumchlorid als auch 1 M Kaliumacetat verwendet werden, aber Kaliumacetat brachte wegen seiner größeren Pufferkapazität eine wesentliche Verkürzung und Standardisierung des Gegenionenaustausches gegenüber Kaliumchlorid. Wegen dieser größeren Pufferkapazität wurde allerdings auch das T_3 von der SP Sephadex C-25-Säule mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 verzögert und in einem breiteren Peak eluiert. Deshalb war unser endgültiges Vorgehen zunächst ein rascher Gegenionenaustausch mit 1 M Kaliumacetat und dann ein kurzzeitiges Nachwaschen mit 1 M Kaliumchloridlösung. Ein Zwischenspülschritt nur mit aqua bidest. kam wegen der dabei auftretenden enormen Volumenexpansion des Austauscherbettes nicht in Frage.

3. Schritt:

Bei der Verwendung einer Lösung mit einem pH über 11 konnten T_3 und T_4 in einem relativ schmalen Peak von den Austauschersäulen eluiert werden. Wie Abbildung 3 zeigt, wurde der T_3 -Peak von einer 5 ml SP Sephadex C-25-Säule mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 in 30 Minuten, was einem Gesamtvolumen von ca. 7,5 ml entspricht, eluiert, wobei die Wiederfinderaten für T_3 zwischen 95 und 98 % lagen. Dieselben Wiederfinderaten konnten zunächst mit AG 50 W X-4 minus 400 mesh (Charge Lot.Nr. 9135), allerdings in einem größeren Elutionsvolumen, erzielt werden. Anlässlich der Lieferung einer neuen Charge AG 50 W X-4 minus 400 mesh (Lot.Nr. 10196) mußten wir dagegen feststellen, daß diese nicht mehr

dieselben Voraussetzungen erfüllte, wie die alte Charge, die aber nicht mehr zu erreichen war. Die Wiederfinderaten des T_3 waren jetzt mit Werten um ca. 75 % unzureichend; offensichtlich wurde ein Teil des Hormons irreversibel an die Austauscherguppen gebunden und ließ sich auch durch den Zusatz von verschiedenen Detergentien nicht ablösen. In diesem Zusammenhang durchgeführte Untersuchungen mit den ebenfalls stark sauren Kationenaustauschern Dowex AG 50 W X-4 200 - 400 mesh und Bio Rad AG 50 W X-2 200 - 400 mesh brachten ebenfalls zu geringe Ausbeuten.

Obwohl, wie Abbildung 3 zeigt, mit einer 0,05 N KOH T_3 in einem noch wesentlich schmaleren Peak von der SP Sephadex C-25-Austauschersäule eluiert werden konnte, verwendeten wir 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3, da mit demselben Puffer auch auf der nachfolgenden Sephadex-Trennsäule T_3 von T_4 abgetrennt werden konnte (s.u. 2.1.3.2.2.1).

Durch Temperatursteigerung und Verminderung der Durchflußrate unter 0,25 ml/min konnte bei Verwendung des 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 keine weitere Verschmälerung des T_3 -Peaks erreicht werden.

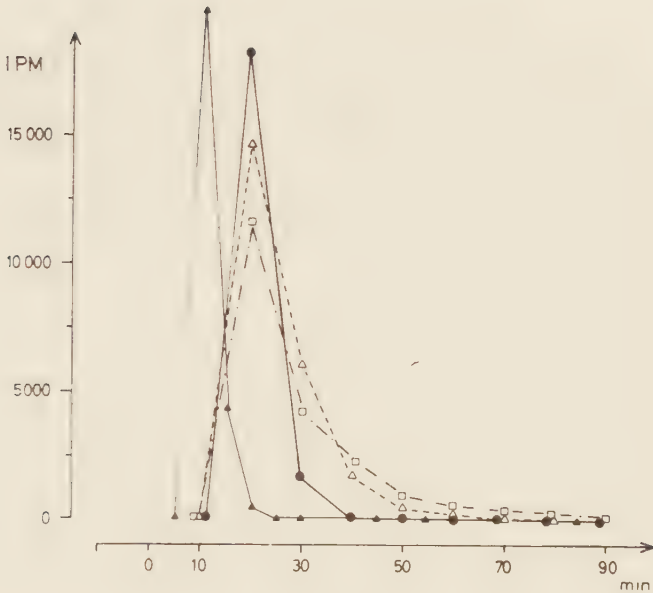


Abb.3: Elutionsdiagramm des T_3 - ^{125}J von den Ionenaustauschersäulen

Aufgezeichnet sind die Elutionsdiagramme des T_3 - ^{125}J von den Austauschersäulen 5 ml SP Sephadex C-25 (●—●), 4 ml AG 50 W X-4 minus 400 mesh Lot.Nr. 9135 (Δ---Δ) und 4 ml AG 50 W X-4 minus 400 mesh Lot.Nr.10196 (□---□) mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 sowie 5 ml SP Sephadex C-25 mit 0,05 N KOH (▲—▲).
Temperatur: 30°C; Durchflußrate: 0,25 ml/min.
Erklärung s. Text (2.1.3.1.2)

2.1.3.2 Trennung von T_3 und T_4 auf Sephadex G-25 superfine

Vor der Messung der Serum- T_3 -Spiegel ist eine vollständige Abtrennung des T_3 vom T_4 Voraussetzung. Denn bei einem Verhältnis der Serumkonzentration von T_3 zu T_4 von

etwa 1 : 40 (20,21) führt die Kontamination des T_3 -Peaks mit z.B. nur 1 % des T_4 schon zu einer fälschlichen Erhöhung der T_3 -Werte beim chemischen Jodnachweis um über 50 %. Außerdem muß eine Dejodierung von T_4 zu T_3 während des Trennvorganges ausgeschlossen werden. In früheren Arbeiten (20,21,32) konnte gezeigt werden, daß zur Abtrennung des T_3 vom T_4 Sephadex G-25 superfine sehr gut geeignet ist.

2.1.3.2.1 Durchführung

Bis zu 25 Säulen mit 2,4 g oder bei späteren Versuchen mit 3,0 g Sephadex G-25 superfine (2.1.2.3) wurden in einem Thermoblock untergebracht und mit einer in ihrem Pumpvolumen verstellbaren 25-Kanal-Peristaltik-Pumpe mit dem jeweils verwendeten Elutionspuffer äquilibriert. Dann wurden die radioaktiven Standards T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J jeweils in 7 ml des Elutionspuffers, was dem Volumen des Elutionspeaks von der Extraktionssäule entsprach (s.o. 2.1.3.1.3), zeitgesteuert angesaugt und anschließend mit der Pufferlösung nachgewaschen. Die jeweiligen Eluate wurden in 10-Minuten-Fractionen mit einem automatischen Fraktionssammler gesammelt und die Radioaktivität an einem Gammameßplatz gemessen.

2.1.3.2.2 Ergebnisse

Wie die Abbildungen 4 und 5 zeigen, ist die Güte der Abtrennung des T_3 vom T_4 neben der Pumpgeschwindigkeit, Gelmenge und der Temperatur abhängig von der Art und dem pH-Wert der Elutionspufferlösung.

2.1.3.2.2.1 Elutionspuffer

Wie Abbildung 4 zeigt, konnte die beste Abtrennung des T_3 vom T_4 mit jeweils einem aktivitätsfreien Intervall zwischen dem T_3 - ^{125}J und dem T_4 - ^{125}J -Peak von 40 Minuten entsprechend 20 ml sowohl bei der Verwendung eines 0,05 M Natriumcarbonatpuffers pH 10,5 als auch eines 0,05 M Kaliumphosphatpuffers pH 11,5 erzielt werden. Mit dem 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 10,5 konnte aber T_3 nicht mehr in einem schmalen Peak von der Extraktions-säule eluiert werden (s.o. 2.1.3.1.3). Zusätzlich machte sich bei der Anwendung der Carbonatpufferlösungen eine Störung des Trennvorgangs durch Entstehen von CO_2 auf der Trennsäule bemerkbar. Abbildung 5 zeigt die Abtrennung des T_3 - ^{125}J vom T_4 - ^{125}J bei Verknüpfung der Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum auf der Kationenaustauschersäule AG 50 W X-4 minus 400 mesh (s.o. 2.1.3.1.3) mit der Trennung auf einer 2,4 g Sephadex G-25 superfine-Säule im geschlossenen System. Bei Erhöhung des pH-Wertes des 0,05 M Kaliumphosphatpuffer von pH 11,0 auf pH 11,5 ergab sich keine signifikante Verschiebung der Elutionspeaks von T_3 und T_4 . Das aktivitätsfreie Intervall zwischen T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J lag bei ca. 40 Minuten, entsprechend 20 ml. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf pH 11,9 dagegen, wurden T_3 und T_4 beschleunigt eluiert, wobei keine ausreichende Auftrennung mehr erzielt werden konnte. Wir wählten deshalb schließlich zur Trennung einen pH-Wert von 11,3.

2.1.3.2.2.2 Pumpgeschwindigkeit

Durch eine Verminderung der Durchflußrate des Kaliumphosphatpuffers von 0,5 ml/min auf 0,25 ml/min konnte bei doppeltem Zeitaufwand keine signifikante Vergrößerung

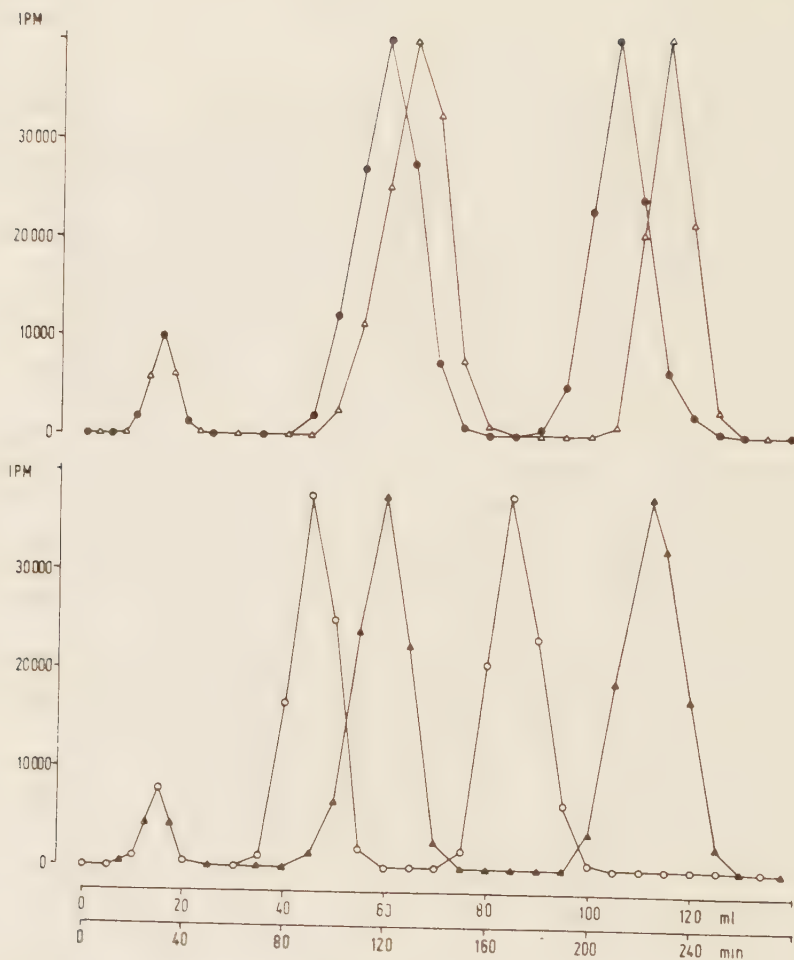


Abb.4: Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J in Abhängigkeit vom Elutionspuffer

Aufgezeichnet sind die Elutionsdiagramme von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J bei Verwendung von 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 10,5 (Δ — Δ) und pH 11,0 ($\bullet$ — $\bullet$) sowie 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,5 ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) und pH 11,9 ($\circ$ — $\circ$).

Pumpgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

Temperatur: 37°C

Gelmenge: 2,4 g Sephadex G-25 superfine

Durchführung s. Text (2.1.3.2.1)

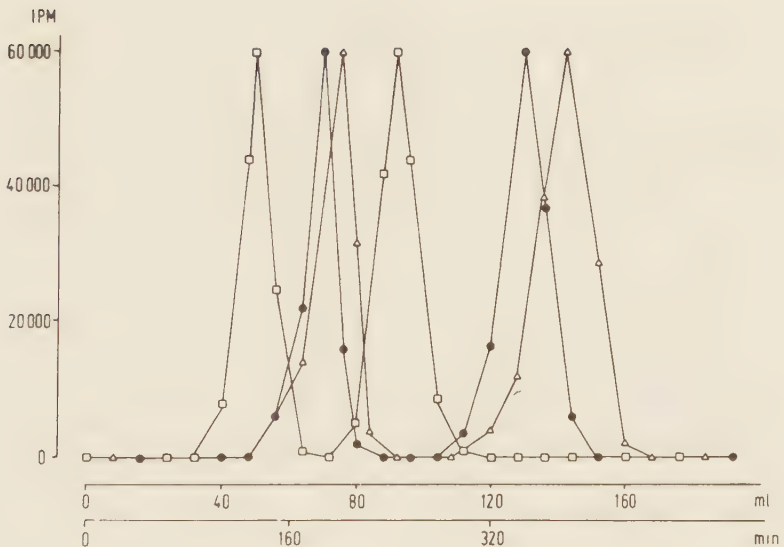


Abb.5: Abtrennung des T_3 - ^{125}J vom T_4 - ^{125}J in Abhängigkeit vom pH-Wert des Elutionspuffers

Aufgetragen sind jeweils die Elutionsdiagramme von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J bei Verknüpfung von Extraktionsschritt auf der Kationenaustauschersäule AG 50 W X-4 minus 400 mesh (2.1.3.1.2) und Trennung auf 2,4 g Sephadex G-25 superfine (2.1.3.2.1) bei Verwendung von 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,0 (Δ — Δ), pH 11,5 ($\bullet$ — $\bullet$) und pH 11,9 ($\square$ — $\square$).
Pumpgeschwindigkeit: 0,37 ml/min
Temperatur: 30° C

des aktivitätsfreien Intervalls zwischen T_3 - und T_4 -Peak erzielt werden. Bei der höheren Pumpgeschwindigkeit ergab sich jedoch auf Grund der hohen Filtrationsdrücke die Schwierigkeit, gleichmäßige Fließraten bei allen 25 Säulen zu erreichen. Als Kompromiß zwischen Zeit- und technischem Aufwand zeigte sich eine Pumpgeschwindigkeit von 0,37 ml/min als günstig.

2.1.3.2.2.3 Gelmenge

Bei Verwendung einer größeren Gelmenge als 3,0 g Sephadex G-25 superfine wurden die Elutionspeaks von T_3 und T_4 breiter, eine signifikante Vergrößerung des aktivitätsfreien Intervalls konnte jedoch nicht erzielt werden.

2.1.3.2.2.4 Temperatur

Bei einer Temperaturerhöhung verschmälerten sich zwar die jeweiligen T_3 - und T_4 -Peaks, aber gleichzeitig verminderte sich auch das aktivitätsfreie Intervall. Am günstigsten erwies sich bei unseren Versuchen eine Temperatur von 30°C .

2.1.3.3 Konzentrierung der T_3 -Peaks

Da das Trijodthyronin nach der chromatographischen Abtrennung vom Thyroxin von der Trennsäule in einem großen Volumen von etwa 20 ml eluiert wird, ist vor dem mikrochemischen Jodnachweis ein Konzentrierschritt erforderlich. Dabei müssen folgende Anforderungen erfüllt sein:

- quantitatives Auffangen des T_3 -Peaks
- kleines Elutionsvolumen von der Konzentriersäule
- keine Störung durch den Konzentrierschritt bei der nachfolgenden chemischen Jodbestimmung

Hierzu wurden in unserem Labor schon früher Kationenaustauscher bzw. Sephadex LH-20 jeweils im sauren Milieu mit gutem Erfolg verwendet (20,21). Auf eine Konzentrierung der T_4 -Peaks nach der chromatographischen Trennung haben wir grundsätzlich verzichtet, da der hierzu benötigte Zeitaufwand beträchtlich ist und uns für die Messung der

Serum- T_4 -Spiegel mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse ein einfaches und empfindliches Verfahren zur Verfügung stand (24).

2.1.3.3.1 Durchführung

Mit einer 25-Kanal-Proportionierpumpe wurden jeweils 0,2 ml T_3 - ^{125}J -Standardlösung in 20 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3, was dem Volumen des T_3 -Elutionspeaks von der Trennsäule entsprach (s.o.2.1.3.2.2.1), angesaugt, über einen Dreiweghahn mit Hilfe einer zweiten Proportionierpumpe kontinuierlich mit 1 N HCl (0,05 ml/min) angesäuert und über die jeweiligen Konzentrationsäulen mit 1 ml Sephadex LH-20 (2.1.2.4) bzw. 2 ml SP Sephadex C-25 (2.1.2.2) gepumpt. Nach einem Zwischenspülschritt mit aqua bidest. wurde das adsorbierte T_3 entweder mit Methanol, einem Methanol-Ammoniak-Gemisch oder mit Ammoniak von der Säule eluiert.

2.1.3.3.2 Ergebnisse

2.1.3.3.2.1 Sephadex LH-20

Ohne vorherige Ansäuerung des Eluats von der Trennsäule wurde der T_3 - ^{125}J -Peak bei einem pH-Wert von 11,3 auf einer LH-20-Säule (2.1.2.4) zwar deutlich verzögert, zur quantitativen Adsorption war aber eine relativ große LH-20-Säule mit über 3 ml Gelbett erforderlich. Durch vorheriges Zuspeisen mit 1 N HCl (0,05 ml/min) wurde dagegen der T_3 - ^{125}J -Peak auf 1 ml LH-20 quantitativ retiniert. Durch einen Zwischenspülschritt mit aqua bidest. wurden die überschüssigen und im chemischen Jodnachweis störenden Kalium-, Chlorid- und Phosphationen entfernt. Danach konnte mit reinem Methanol oder mit einem 1:1 (V/V)-

Gemisch aus reinem Methanol und 25%igem Ammoniak das T_3 - ^{125}J in einem Volumen von 4 ml von der Konzentriersäule eluiert werden. Bei der Elution mit reinem Methanol entstand ein weißer Niederschlag im Eluat, der aus den Pumpenschläuchen (Weichmacher ?) stammte und in der mikrochemischen Jodbestimmung störte.

2.1.3.3.2.2 SP Sephadex C-25

Bei kontinuierlicher Ansäuerung des Eluats von der Trennsäule (s.o.2.1.3.3.2.1) konnte der T_3 - ^{125}J -Peak auf einer 2 ml SP Sephadex C-25-Säule quantitativ retiniert werden. Wieder nach einem Zwischenspülschritt mit aqua bidest. konnte dann das T_3 - ^{125}J mit einer 10%igen NH_3 -Lösung in einem Volumen von 3 ml eluiert werden. Die Wiederfinderraten waren bei Werten um 98% sehr zufriedenstellend und gut reproduzierbar.

2.1.3.4 Einengen der Eluate von den Konzentriersäulen

Vor dem letzten Schritt - der chemischen Jodbestimmung - ist ein vollständiges Verdampfen der Eluate von den T_3 -Konzentriersäulen erforderlich, wobei selbstverständlich keine Verluste an T_3 und keine zusätzlichen Verunreinigungen der Proben auftreten dürfen.

2.1.3.4.1 Einengen im offenen System

Ein Einengen der Eluate bei Anlegen eines Unterdruckes mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ist zeitaufwendig und zudem problematisch wegen der dabei auftretenden Siedeverzüge. Wird dagegen mit der Wasserstrahlpumpe Luft über die Proben angesaugt, so können diese sehr rasch und unproblematisch in weniger als 15 Minuten einge-

dampft werden. Allerdings werden aus der Zimmerluft Verunreinigungen in den Proben konzentriert, die den nachfolgenden chemischen Jodnachweis empfindlich stören. Die Zimmerluft kann im Prinzip ausreichend vorge-reinigt werden, indem sie nacheinander durch konzen-trierte Natronlauge und konzentrierte Schwefelsäure ge-leitet wird (Abbildung 6), allerdings ist dieses Ver-fahren störanfällig. Der Einengvorgang vor der nach-folgenden chemischen Jodbestimmung war am besten stan-dardisiert, wenn die Proben unter nachgereinigtem Stick-stoff eingedampft wurden, wobei allerdings erhebliche Mengen an nachgereinigtem Stickstoff für einen Eindampf-schritt erforderlich waren.

2.1.3.4.2 Einengen im geschlossenen System (20,21,32)

Um den Bedarf an nachgereinigtem Stickstoff während des Einengvorgangs auf ein vertretbares Maß zu reduzieren, haben wir schließlich die Proben im geschlossenen System unter rezirkulierendem Stickstoff eingeengt (Abbildung 7). Über eine Membranpumpe wird der nachgereinigte Stickstoff nach Erhitzen (Heizspirale) über die Proben (Wasserbad, 70°C) gepumpt. Nach Passage einer Kühlschlange perlt der Stickstoff durch zwei Flaschen mit konzentrierter Schwefelsäure (Reinigung und Trocknung) und wird danach wieder über die Proben geleitet. Eventuelle Verluste werden kontinuierlich aus einer Flasche mit nachgerei-nigtem Stickstoff ausgeglichen. Dieses Verfahren er-laubte das vollständige, simultane Eindampfen der Pro-ben in ca. 15 Minuten. Eine Vorratsflasche mit 40 Liter nachgereinigten Stickstoffs reichte bei diesem Vorgehen mehrere Monate.

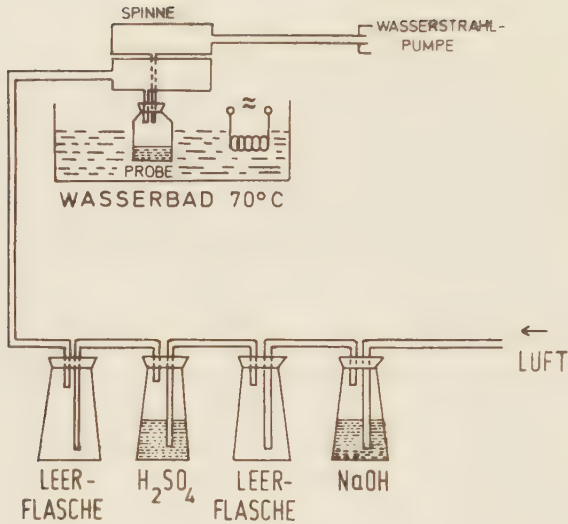


Abb.6: Apparatur zum Einengen im offenen System

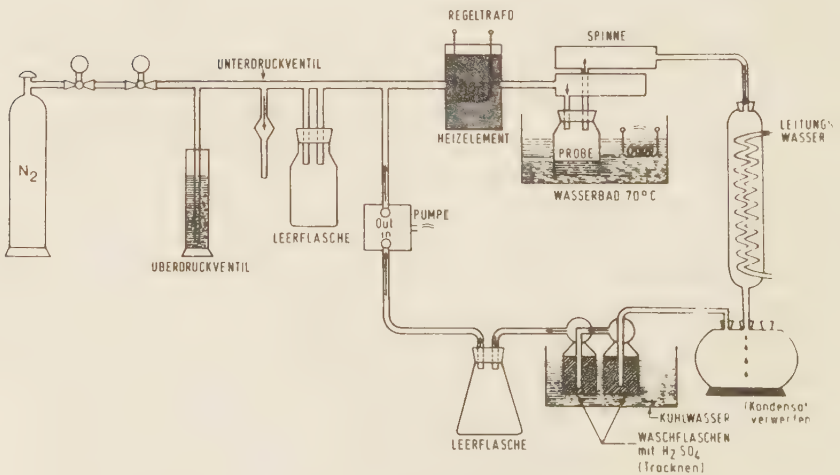
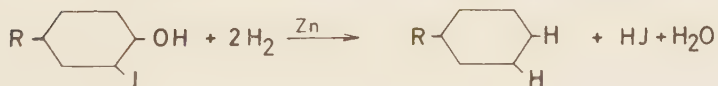


Abb.7: Apparatur zum Einengen unter rezirkulierendem Stickstoff

2.1.3.5 Dejodierung der Jodaminosäuren

Die von uns verwendete Methode zum chemischen Jodnachweis beruht auf dem Prinzip der pseudokatalytischen Wirkung von anorganischem Jodid auf die Reaktion zwischen Cer(IV) und Arsen(III). Um nun die Unterschiede in der "katalytischen" Wirksamkeit der einzelnen Jodaminosäuren - bezogen auf ihren Jodgehalt - ausgleichen zu können und um alle zu untersuchenden Jodverbindungen auf eine Jodideichkurve beziehen zu können, ist es notwendig, das Jod aus seiner organischen Bindung freizusetzen. Dazu verwendeten wir das Verfahren der katalytischen Reduktion (35,36). Dabei wird organisch gebundenes Jod durch nascierenden Wasserstoff freigesetzt:



Als Hydrierungskatalysator verwendeten wir kupferaktiviertes Zink, dessen Aktivität gegenüber aromatischen Verbindungen größer ist, als die reinen Zinks und zwar im alkalischen Milieu, um den entstehenden Jodwasserstoff zu binden.

2.1.3.5.1 Durchführung (20,21,35)

Die T_3 - ^{127}J -Eichstandardlösungen (2.1.1.2) wurden auf 2 ml SP Sephadex C-25-Säulen konzentriert und anschließend mit 10%iger Ammoniaklösung eluiert (s.o. 2.1.3.3.2.2). Den Eluat wurde vor dem Einengschritt eine Spatelspitze, entsprechend 5 mg, kupferaktivierten

Zinkstaubs (2.1.1.5) zugegeben, so daß die reduktive Dehalogenierung schon während des Einengschrittes ($T = 70^{\circ}\text{C}$) erfolgen konnte. Um jedoch eine standardisierte, vollständige Dejodierung zu gewährleisten, wurde der in 1 N NaOH aufgenommene Rückstand zur Sicherheit nochmals 30 Minuten mit frisch zugegebenem kupferaktivierten Zinkstaub geschüttelt.

2.1.3.5.2 Ergebnisse

Wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen, ist die Dejodierung der Jodaminosäuren Monojodtyrosin (MIT), Dijodtyrosin (DIT), Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) mit dem Verfahren der katalytischen Reduktion nahezu vollständig und sehr gut reproduzierbar. Die Eichkurven für T_3 und T_4 sind praktisch identisch mit der Jodideichkurve.

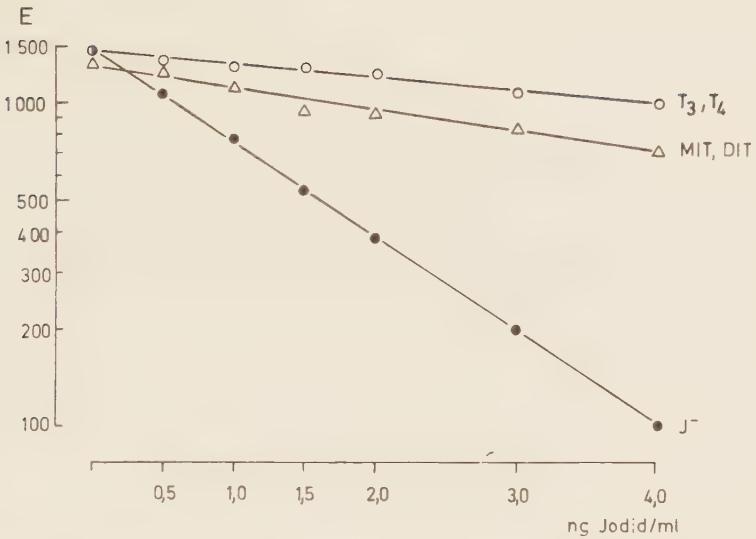


Abb.8: Jodnachweis in Jodaminosäuren mit der Ce (IV)/As (III)-Reaktion ohne vorherige Dejodierung

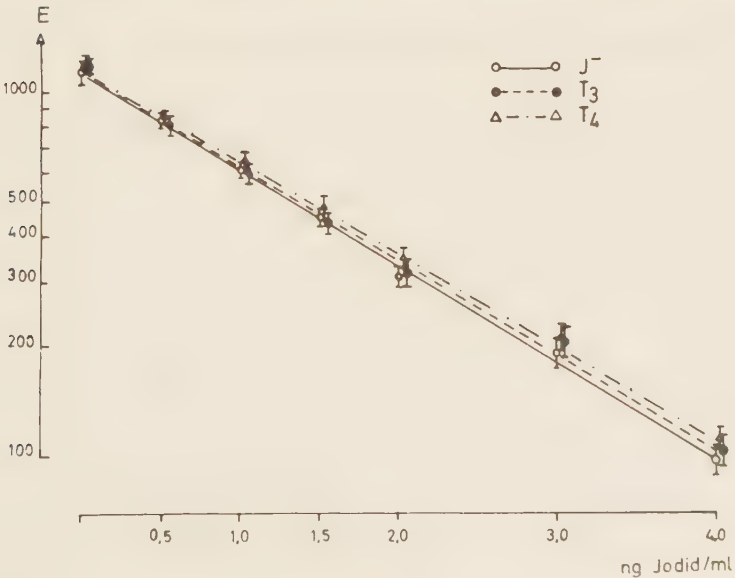
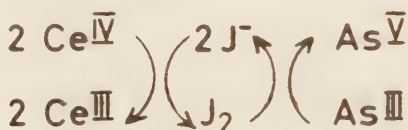


Abb.9: Jodnachweis in Jodaminosäuren nach Dejodierung durch kupferaktivierten Zinkstaub

2.1.3.6 Automatisierte Jodbestimmung

Den ersten Hinweis auf den katalytischen Effekt von anorganischem Jodid auf die Reaktion zwischen Cer(IV) und Arsen(III) in verdünnter Schwefelsäure gaben Sandell und Kolthoff 1934 (37). Heute wird allgemein dem Jodid eine pseudokatalytische Wirkung in der Redoxreaktion zwischen Cer und Arsenit zugeschrieben (38):



Die Geschwindigkeit der Reduktion des gelben Cer(IV) zum farblosen Cer(III) ist ein Maß für die Konzentration an anorganischem Jodid.

2.1.3.6.1 Durchführung (20,21,35,39)

Abbildung 10 zeigt schematisch die Durchführung der automatisierten Jodbestimmung. Die Jodideichstandardlösungen und die dejodierten Proben (nach Abzentrifugieren des kupferaktivierten Zinkstaubs) werden zeitgesteuert (30 Proben/Stunde, Probennahmezeit : Spülzeit = 1 : 2) über einen Probennehmer (vom PB¹²⁷I-Autoanalyzer, Fa. Technicon, Frankfurt) über eine 13-Kanal-Proportionierpumpe (Fa. Ismatec, Zürich/Schweiz) angesaugt und kontinuierlich mit Säuregemisch, Arseniger Säure und Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung (s.o. 2.1.1.6) vermischt (Mischschlangen). Nach 18 Minuten Verzögerung im Ölheizbad bei $70^\circ\text{C} \pm 0,01^\circ\text{C}$ (Thermomix variabel^R, Fa. Braun, Melsungen) wird bei 366 nm im Eppendorf-Photometer (Durchlaufküvette) die Transmission gemessen und durch einen

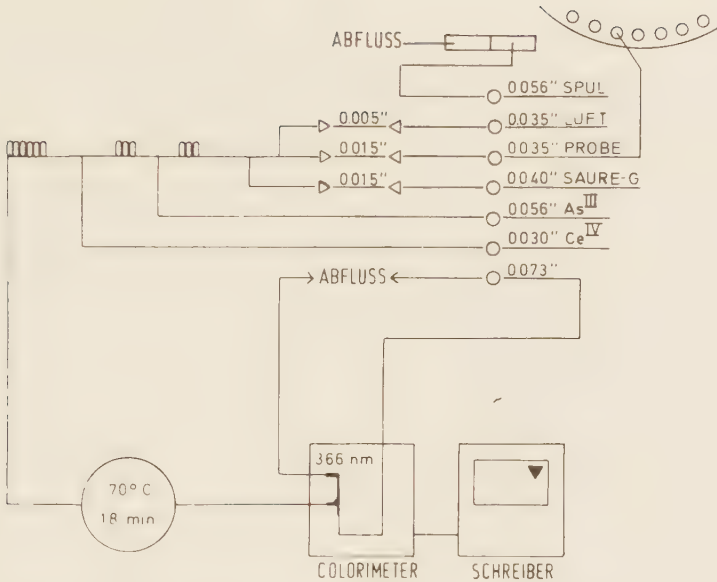


Abb.10: Fließschema der automatisierten Jodbestimmung

an das Photometer angeschlossenen Schreiber (Servogor, Fa. Metrawatt AG, Nürnberg) aufgezeichnet.

2.1.3.6.2 Ergebnisse

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich ist, konnte eine ausreichend steile Standardeichkurve von 0 - 8 ng Jodid/ml erzielt werden. Die Präzision in der Serie war, wie man aus den Dreifachbestimmungen in Abbildung 11 ersehen kann, ebenfalls sehr zufriedenstellend. Die Empfindlichkeit des Jodnachweises in den eingedampften Proben konnte noch gesteigert werden, wenn der Rückstand nach dem Eingschritt in 0,5 ml 1 N NaOH anstatt in 1 ml 1 N NaOH aufgenommen wurde.

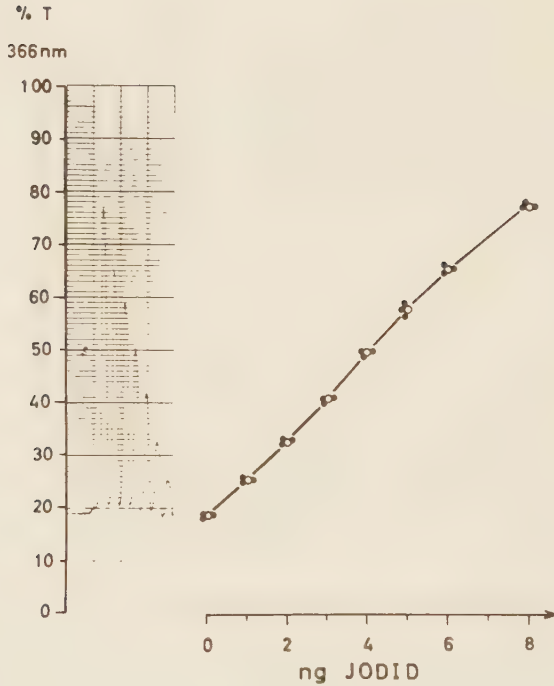


Abb.11: Jodidstandardeichkurve

Aufgezeichnet ist auf der linken Seite eine vom Schreiber aufgezeichnete Jodideichkurve, auf der rechten Seite die Mittelwerte (○) von Dreifachbestimmungen (●) im Bereich von 0 - 8 ng Jodid.

2.1.4 Abtrennung des T_3 vom T_4 aus dem Serum im geschlossenen säulenchromatographischen System mit anschließendem chemischen Jodnachweis

Zur getrennten Bestimmung der Trijodthyroninspiegel im Serum waren, wie oben beschrieben, nacheinander folgende Schritte erforderlich:

- Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum (2.1.3.1)
- Abtrennung des T_3 vom T_4 (2.1.3.2)
- Konzentrierung des T_3 -Peaks von der Trennsäule (2.1.3.3)
- Einengen des T_3 -Peaks von der Konzentrationsäule (2.1.3.4)
- reduktive Dejodierung des T_3 (2.1.3.5)
- chemischer Jodnachweis des T_3 (2.1.3.6).

2.1.4.1 Durchführung

Die Verknüpfung dieser einzelnen Schritte ist schematisch in Abbildung 12 aufgezeichnet. 25 Kationenaustauschersäulen mit jeweils 5 ml SP Sephadex C-25 (s.o. 2.1.2.2) sind über Dreiweghähne mit 25 3g - Sephadex G-25 - Säulen (s.o. 2.1.2.3), die vorher mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 vorgespült waren, verbunden. Sowohl die Austauschersäulen als auch die Sephadex-Trennsäulen werden jeweils in einem Thermoblock auf 30°C temperaturkonstant gehalten.

Nach ca.15 Minuten Vorwaschen mit 0,1 N HCl werden mit Hilfe einer steuerbaren 25-Kanal-Proportionierpumpe aus 25 Probengefäßen 2,5 ml Serum, dem als Internal Standard jeweils 0,1 ml T_3 - ^{125}J -Tracerlösung (0,02 μCi , T_3 - ^{127}J odgehalt ca. 0,1 - 0,5 ng) zugesetzt war, oder zur Qualitätskontrolle stabile und radioaktive Standardlösungen von T_3 und T_4 (s.o. 2.1.1.1 und 2.1.1.2) quantitativ angesaugt und über die Austauschersäulen gepumpt (Pumpgeschwindigkeit : 0,125 ml/min). Durch Nachwaschen

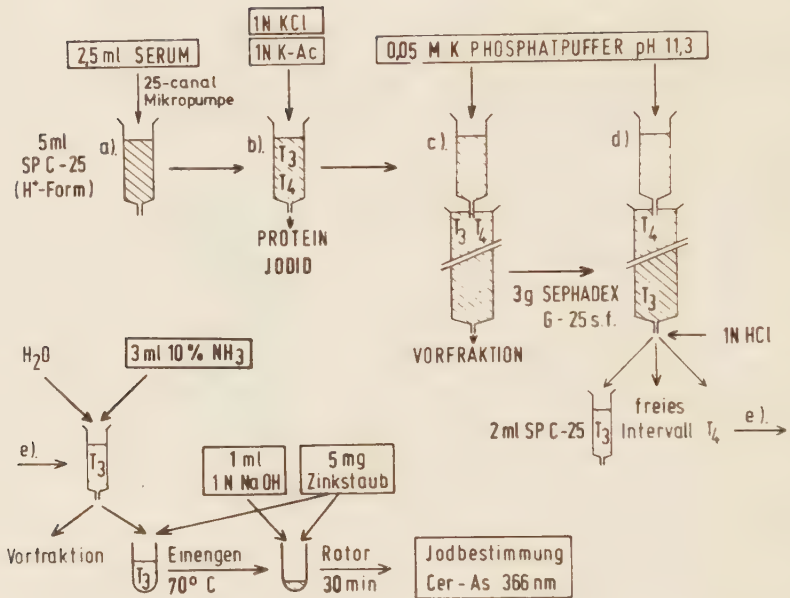


Abb.12: Schematische Darstellung der Abtrennung des T₃ vom T₄ aus dem Serum im geschlossenen säulen-chromatographischen System mit anschließendem chemischen Jodnachweis

mit 0,1 N HCl wurden die Serumproteine und anorganisches Jodid in 10 Minuten über die Dreiweghähne verworfen, während T₃ und T₄ auf den Säulen quantitativ retiniert wurden (2.1.3.1.3).

Mit 1 M Kaliumacetatlösung für 7 Minuten und 1 M Kaliumchloridlösung für 15 Minuten wurden bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,37 ml/min die H⁺-Gegenionen des Austauschers quantitativ gegen K⁺-Ionen ausgetauscht (2.1.3.1.3).

Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 ml/min wurden T₃

und T_4 anschließend mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 in einem schmalen Peak von der Austauschersäule durch Umstellen der Dreiweghähne auf die Sephadex-Trennsäulen eluiert. Ein Vorlauf von 10 Minuten wurde verworfen (2.1.3.1.3). Mit demselben 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 erfolgte nun die Abtrennung des T_3 vom T_4 auf der Sephadex-Trennsäule. Zur Beschleunigung des Trennvorganges wurde nach 60 Minuten die Pumpgeschwindigkeit auf 0,30 ml/min erhöht. Wie Abbildung 13 zeigt, wurde das T_3 nach 160 Minuten in einem Gipfel von ca. 80 Minuten eluiert. Bis zum Anstieg des T_4 -Peaks bestand ein freies Intervall von ca. 80 Minuten (2.1.3.2.2).

Dieser T_3 -Gipfel wurde nach Verwerfen einer Vorfraktion von 140 Minuten auf 25 2ml SP Sephadex C25-Säulen, die wieder über Dreiweghähne mit den Trennsäulen verbunden waren, bis zur 250. Minute im sauren Milieu quantitativ retiniert. Hierzu wurden die Eluate der Trennsäulen mit Hilfe einer zweiten Proportionierpumpe über die Dreiweghähne mit 1 N HCl (Pumpgeschwindigkeit: 0,05 ml/min) kontinuierlich angesäuert (2.1.3.3.2.2).

Nach quantitativem Auffangen des T_3 -Peaks wurden die Konzentrationsäulen aus dem System entfernt. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,6 ml/min wurden die Konzentrationsäulen zunächst 6 Minuten mit aqua bidest. gespült und der T_3 -Peak mit einer 10%igen Ammoniaklösung, nach Verwerfen einer Vorfraktion von 3 Minuten in 6 Minuten quantitativ in 20 ml - Glasgefäße (Liquid scintillation tube, Fa. Packard, Breda/Holland) eluiert (2.1.3.3.2.2).

Nach Zugabe von jeweils einer Spatelspitze entsprechend 5 mg kupferaktivierten Zinkstaubs zur reduktiven Dejodierung des T_3 wurden die Proben im geschlossenen System unter rezirkulierendem Stickstoff in 15 Minuten vollständig eingedampft (2.1.3.4.2). Anschließend wurden die Rückstände in je 1 ml 1 N NaOH aufgenommen und

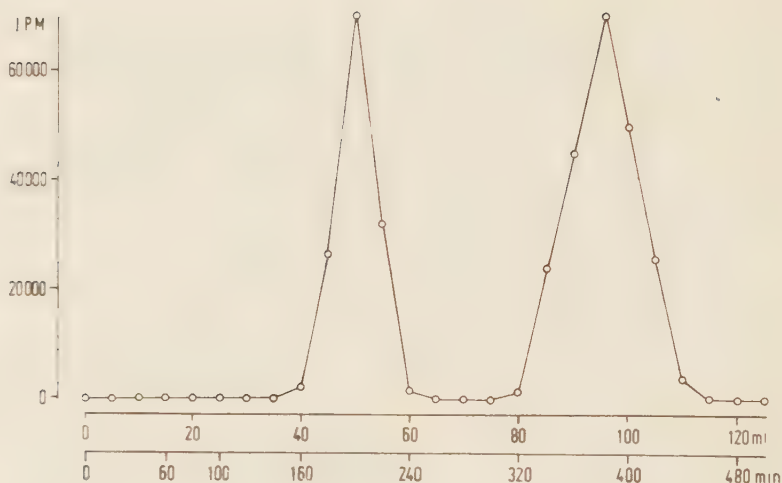


Abb.13: Schematische Darstellung der Abtrennung des T_3 - ^{125}J vom T_4 - ^{125}J

Aufgetragen ist das Elutionsdiagramm von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J bei Verknüpfung von Extraktionsschritt auf der 5 ml SP Sephadex C-25 Kationenaustauschersäule (2.1.3.1.2) und anschließender Trennung auf 3 g Sephadex G-25 superfine (2.1.3.2.1) bei Verwendung von 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 (○—○).
 Pumpgeschwindigkeit: 0,37 ml/min
 Temperatur: 30°C

zur Gewährleistung einer vollständigen Dejodierung des T_3 nochmals mit einer Spatelspitze kupferaktivierten Zinkstaubs versetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt (2.1.3.5.1).

Nach Abzentrifugation des Zinkstaubs konnten die Jodgehalte der Überstände mit der automatischen Jodbestimmung gemessen werden (2.1.3.6.1).

Blindwerte und Vollständigkeit der Dejodierung des T_3 wurden immer mit T_3 -Eichstandardlösungen von

0 - 8 ng T_3 -J/ml (2.1.1.2) überprüft, die ohne vorherige chromatographische Auftrennung direkt auf die 2 ml SP Sephadex C-25-Konzentriersäulen aufgetragen wurden. Auf die Messung von T_4 -Spiegeln im Serum mit diesem Verfahren wurde wegen des erheblichen Zeitaufwandes (Abbildung 13) prinzipiell verzichtet, zumal uns mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse dafür eine einfache und empfindliche Methode zur Verfügung stand (24).

2.1.4.2 Auswertung

Nach Abzug des Blindwertes wurde der T_3 - ^{127}J -Gehalt der Proben an Kaliumjodidstandardeichkurven (Abbildung 11) abgelesen, mit den Wiederfinderaten und dem jeweiligen T_3 -J-Gehalt (0,1 - 0,5 ng T_3 -J, s.o. 2.1.1.1) des als Internal Standard zugegebenen T_3 - ^{125}J ($85\% \pm 6\%$, $\bar{x} \pm s$) korrigiert und auf den T_3 - ^{127}J -Gehalt von 1 ml Serum umgerechnet. Durch Multiplikation mit dem Faktor 1,53 errechneten sich die absoluten T_3 -Spiegel.

Es wurden prinzipiell mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Dreifachbestimmungen waren wegen der dafür benötigten Serummengen oftmals nicht möglich. Ergebnisse wurden nur akzeptiert, wenn die Doppelwerte eine gute Übereinstimmung zeigten.

2.2 Ergebnisse der T_3 -Bestimmung im Serum

2.2.1 Statistische Qualitätskontrolle

2.2.1.1 Die Wiederfinderaten von radioaktiven T_3 - ^{125}J -Standards waren bei Chromatographie über das gesamte System bei Werten von Tag zu Tag um $85 \pm 6\%$ ($\bar{x} \pm s$) sehr zufriedenstellend.

2.2.1.2 Die Wiederfinderaten von stabilen T_3 - ^{127}J -Eichstandardlösungen waren mit Werten von Tag zu Tag um $80 \pm 7\%$ ($\bar{x} \pm s$) ebenfalls zufriedenstellend.

2.2.1.3 Spezifität

Anorganisches Jodid wird mit den Serumproteinen schon auf der ersten Kationenaustauschersäule eluiert und verworfen.

Die Schilddrüsenhormonvorstufen Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) werden nach früheren Untersuchungen (20,21,32) zwar auf der Extraktionssäule adsorbiert, aber von der Trennsäule deutlich vor dem T_3 -Peak eluiert und damit mit dem Vorlauf verworfen.

Ein Zusatz von 400 ng säulenchromatographisch vorge-reinigten Thyroxins (Abbildung 11) zum Serum brachte keine signifikante Erhöhung der Serum- T_3 -Spiegel. Hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (20,21), nach denen die Kontamination des T_3 -Peaks durch T_4 bei Werten unter 0,1 % lag.

Dagegen mußten wir in einigen Fällen eine Kontamination des T_3 -Peaks durch hohe Konzentrationen an Röntgenkontrastmitteln, was sich durch Jodverseuchung des Serums bei der $PB^{127}I$ -Bestimmung zeigte, feststellen.

2.2.1.4 Normalbereich

Zur Ermittlung eines Normalbereiches wurden die Serum- T_3 -Spiegel von neun schilddrüsengesunden Kontrollpersonen gemessen. Der statistisch berechnete Normalbereich ($\bar{x} \pm 2 s$), der bei neun schilddrüsengesunden Patienten ermittelt wurde, lag mit Werten zwischen 41 und 73 ng T_3 /100 ml Serum deutlich unter den in der Literatur mitgeteilten Bereichen (4-24). Zur Frage der absoluten Richtigkeit dieses ermittelten Normalbereiches s.u.

2.2.2.

2.2.2 Diskussion der Nachteile der Methode

Die von uns beschriebene Methode erlaubt die gleichzeitige Analyse von 25 Proben im geschlossenen säulenchromatographischen System. Die Wiederfinderaten waren mit $80 \pm 7\%$ ($\bar{x} \pm s$) zufriedenstellend, ebenso die Trennung des T_4 vom T_3 : weniger als 0,1% des T_4 gingen in die T_3 -Bestimmung ein.

Diesen Vorteilen stehen eine Reihe von Nachteilen gegenüber, die es richtig erscheinen lassen, die vorliegende Methode nicht als eine endgültige Bestimmungsmethode, sondern als einen Diskussionsbeitrag zur Bestimmung der Trijodthyroninspiegel im Serum zu betrachten.

Der Zeitaufwand ist bei einer reinen Bestimmungszeit von 6 Stunden beträchtlich. Neben einer gewissen Störanfälligkeit durch "Blanks" von den Säulen konnte eine Kontamination des T_3 -Peaks durch jodhaltige Kontrastmittel nicht immer mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Empfindlichkeit des Jodnachweises ist nicht zufriedenstellend, da der ermittelte Normalbereich in den unteren Teil der Eichkurve zu liegen kommt. Eine sichere Ursache für den im Vergleich zu anderen Verfahren sehr niedrigen Normalbereich konnte von uns nicht ermittelt werden. Dabei wäre in erster Linie an eine unvollständige Extraktion des endogenen T_3 aus dem Serum auf der ersten Kationenaustauschersäule SP Sephadex C-25 zu denken, auch wenn radioaktive Kontrollversuche eine nahezu vollständige Extraktion zeigten (s.o. 2.1.3.1.3).

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der wichtigsten bisherigen Bestimmungsmethoden für T_3 , die zeigt, wie stark die errechneten Normalbereiche bei den verschiedenen Nachweismethoden (Papierchromatographie, chemischer Nachweis, CPBA, radioimmunologische Methode)

Tabelle 1:

Autor	Methode	Normalbereich $\bar{x} \pm s$	Jahr der Veröffentlichung
Nauman et al.	Papierchromatograph.	330 $\pm$ 70	1967
Sterling et al.	"	220 $\pm$ 27	1969
Radichevich/Werner	"	240 $\pm$ 50	1971
Wahner/Gorman	"	243 $\pm$ 40	1971
Larsen	"	180 $\pm$ 40	1971
Horn,Ruhl et al.	chemisch	146 $\pm$ 20	1972
Schreiber et al.	chemisch	220 $\pm$ 50	1972
Fisher/Dussault	CPBA	98 $\pm$ 48	1971
Habermann	CPBA	139 $\pm$ 20	1973
Gharib et al.	RIA,ohne Zusatz	218 $\pm$ 55	1971
Mitsuma et al.	RIA,Tetrachlor- thyroxin	137 $\pm$ 23	1971
Mitsuma et al.	RIA,mit ANS	134 $\pm$ 6,2	1972
Chopra et al.	RIA,T ₄ im Überschuß	<100 $\pm$ 170	1971
Hesch	RIA,Merthiolat	120 $\pm$ 30	1973
Evered	RIA,Salicylat	126 $\pm$ 23	1973
Liebllich/Utiger	RIA,Diphenylhydantoin	145 $\pm$ 25	1972
Surks et al.	RIA,Extraktion auf Sephadex G-25	146 $\pm$ 24	1972
Hesch et al.	RIA,Extr. (AG 50)	135 $\pm$ 29	1972
Burger et al.	RIA,Extr. (LH 20)	153 $\pm$ 58	1973

differieren. Dabei treten je nach Methode verschiedene Störfaktoren auf: So konnten Fisher und Dussault (23) nachweisen, daß die Ergebnisse der Methode von Sterling (14) durch Artefakte, wie z.B. entstehende Methylester verfälscht werden. Sowohl bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse als auch bei der radioimmunologischen Methode und in geringerem Maße auch bei den chemischen Methoden spielt die Kreuzreaktion mit T_4 eine Rolle. Probleme bereitet bei allen Methoden die vollständige Ablösung des T_3 aus seiner Proteinbindung.

Als weiteres Vorgehen bietet sich die Bestimmung des T_3 mit der sehr spezifischen radioimmunologischen Methode nach vorheriger chromatographischer Extraktion und Trennung von T_3 und T_4 an.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß, obwohl begründete Zweifel an der Richtigkeit der von uns ermittelten Absolutwerte bestehen, die Werte untereinander trotzdem verglichen und klinische Rückschlüsse gezogen werden können.

2.2.3 Klinische Ergebnisse

Die Schilddrüsenüberfunktion zeigt in 95% der Fälle eine gute Übereinstimmung zwischen den klinischen Zeichen der vermehrten peripheren Schilddrüsenhormonwirkung und den Ergebnissen der konventionellen Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. Thyroxinspiegel im Serum, T_3 -in vitro-Test und dementsprechend auch der Index des freien Schilddrüsenhormons, der sich aus dem Produkt von Gesamthormonspiegel und prozentualem freien Anteil des Schilddrüsenhormons ($\text{Gesamt-}T_4 \times T_3\text{-in vitro-Test}$) berechnet, sind erhöht.

Bei Patienten mit einer endokrinen Ophthalmopathie bestehen jedoch besondere Schwierigkeiten in der Beurteilung der Schilddrüsenfunktion, wenn die T_4 -Spiegel im Serum normal sind, klinisch jedoch Hinweise für eine vermehrte Schilddrüsenhormonwirkung bestehen (Herzrhythmusstörungen, Gewichtabnahme, Tachykardie), und wenn zusätzlich die Radiojodaufnahme der Schilddrüse durch Zufuhr von exogenem Schilddrüsenhormon (T_3 -Suppressionstest) nicht zu supprimieren ist. Diese Befundkonstellation schließt bei diesen Patienten eine Euthyreose aus. Auffällig ist zusätzlich, daß der Versuch einer exogenen Suppression der ^{131}J -Aufnahme mit Trijodthyronin von den Patienten oftmals nicht toleriert wird. Deshalb haben wir bewußt dieses Krankheitsbild der endokrinen Ophthalmopathie gewählt, um nach Fällen einer T_3 -Hyperthyreose (s.o. 1.) zu suchen.

Untersucht wurden insgesamt neun Fälle von endokriner Ophthalmopathie. Bei einigen war die Diskrepanz zwischen dem klinischen Aspekt und den Ergebnissen der konventionellen Schilddrüsenfunktionsdiagnostik besonders auffällig. Bei drei von diesen neun Patienten (W.E., W.H., K.F.) ließ sich anhand der konventionellen

Schilddrüsenfunktionsdiagnostik (T_4 -J, T_3 -in vitro-Test, Index des freien Schilddrüsenhormons) eine Schilddrüsenüberfunktion (Morbus Basedow) vermuten (Tabelle 2). Erwartungsgemäß fanden wir bei diesen Patienten über die Norm erhöhte T_3 -Spiegel im Serum. Dieser Befund der erhöhten peripheren Schilddrüsenhormonspiegel erklärt die Suppression der endogenen TSH-Spiegel, die auch durch exogenes TRH nicht zu durchbrechen war.

Bei dem 41-jährigen Patienten B.E. war der Anlaß zur Abklärung der Schilddrüsenfunktion eine intermittierende absolute Arrhythmie des Herzens bei diskreter Ophthalmopathie. Die konventionelle Schilddrüsenfunktionsdiagnostik zeigte als einzigen auffälligen Befund eine fehlende Supprimierbarkeit der Radiojodspeicherung durch exogenes T_3 . Auf Grund des signifikant erhöhten T_3 -Spiegels bei normalem T_4 -J und normalem T_3 -in vitro-Test sind die Voraussetzungen zur Diagnose einer T_3 -Hyperthyreose gegeben (3,14). Erwartungsgemäß fand sich hier eine TRH-refraktäre TSH-Suppression.

Die zur Zeit der Untersuchung hochnormalen T_3 -Spiegel bei T.F. können die TSH-Suppressionen bei normalem T_4 -Spiegel nicht erklären.

Die in der Tabelle folgenden vier Patienten (G.T., H.M., H.F., Sch.M.) zeigten im Lauf der klinischen Beobachtung (z.T. unter Therapie) immer noch Zeichen der vermehrten Schilddrüsenhormonwirkung, obwohl sie anhand der konventionellen Schilddrüsenfunktionsdiagnostik Hinweise auf einen Thyroxinmangel erkennen ließen. Zwei dieser Patienten (G.T., H.M.) hatten jedoch signifikant erhöhte T_3 -Spiegel, während bei den beiden anderen Patienten (Sch.M., H.F.) die T_3 -Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Tabelle 2:

Name	Therapie	T ₄ -J [*]	% T ₃ -uptake ^{**}	Index ^{***}	Δ TSH ^{****}	T ₃ ^{*****}
W.E.	∅	8,2	56,2	4,61	o	217
W.H.	∅	6,8	40,6	2,76	o,7	98
K.F.	∅	5,9	52,9	3,12	o,4	117
B.E.	∅	4,4	35,7	1,57	o	102
T.F.	∅	4,4	41,9	1,84	o,5	70
G.T.	∅	3,1	30,7	0,95	2,1	106
H.M.	+	2,8	37,4	1,05	o	140
Sch.M.	+	1,8	36,2	0,65	o	o
H.F.	+	1,7	29,0	0,49	o	o
R.S.	+	5,9	30,6	1,81	o	51
D.F.	∅	3,8	35,5	1,35	o	117

* (μg/100 ml)

** (T₃-in vitro-Test)

*** Index des freien Schilddrüsenhormons (μg/100 ml)

**** (μ E/ml)

***** (ng/100 ml)

Bei der Patientin R.S. bestand klinisch eine Schilddrüsenüberfunktion trotz zweimaliger Radiojodtherapie. Die endogene TSH-Suppression kann hier bei normalem T_3 -Spiegel nicht durch eine T_3 -Hyperthyreose erklärt werden, sondern muß als persistierende TSH-Suppression nach langdauernder Hyperthyreose gedeutet werden.

Dagegen war bei dem Patienten D.F. mit dekompensiertem autonomen Adenom der T_3 -Spiegel im Serum bei normalem T_4 deutlich erhöht.

In vier von den acht Fällen mit nicht erhöhtem T_4 -Spiegel und nicht erhöhtem T_3 -in vitro-Test muß somit vermutet werden, daß die klinischen Zeichen der erhöhten peripheren Schilddrüsenhormonwirkung durch eine Hypertrijodthyroninämie erklärt werden können. Bei den restlichen vier Fällen läßt sich eine Ursache für die Suppression der TSH-Sekretion an den beiden Parametern Thyroxin und Trijodthyronin nicht ablesen. Diskutiert werden muß ein erhöhter Schilddrüsenhormonumsatz oder eine persistierende TSH-Suppression nach länger andauernder Schilddrüsenüberfunktion analog zur bekannten Suppression der ACTH-Sekretion bei einigen Fällen von behandeltem Cushing-Syndrom und nach Steroidtherapie.

3. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine automatisierte Methode zur Bestimmung der Trijodthyroninspiegel im Serum beschrieben. Die nachfolgenden Einzelschritte:

- Extraktion des Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) aus dem Serum auf Kationenaustauscher SP Sephadex C-25
- Abtrennung des Trijodthyronin vom Thyroxin auf Dextrangel Sephadex G-25 superfine
- Konzentrierung des isolierten Trijodthyronins

erfolgten in einem geschlossenen säulenchromatographischen System. Der T_3 -Jod-Gehalt wird nach reduktiver Dehalogenierung durch kupferaktivierten Zinkstaub chemisch gemessen.

Durch die simultane parallele Säulenchromatographie können 25 Proben in etwa 6 Stunden bestimmt werden.

Bei neun schilddrüsengesunden Kontrollpersonen fanden sich Serum- T_3 -Spiegel von 57 ± 8 ng/100 ml ($\bar{x} \pm s$).

Bei drei von neun untersuchten Patienten mit endokriner Ophthalmopathie fanden sich bei normalem T_4 -Spiegel signifikant erhöhte Serum- T_3 -Spiegel, ebenso bei einem Patienten mit dekompensiertem autonomen Adenom. Es handelt sich demnach hierbei um vier Fälle von T_3 -Hyperthyreose.

Die methodischen Probleme der verschiedenen Bestimmungsverfahren von Trijodthyronin im Serum werden diskutiert.

4. LITERATUR

1. SCRIBA, P.C.: Schilddrüsenkrankheiten. In: K.Schwarz und P.C.Scriba, Endokrinologie für die Praxis. München, Lehmann 1970
2. HEINZE, H.G., K.FREY und P.C.SCRIBA: Methoden und Ergebnisse der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik im Bayer.Jodmangelgebiet. Fortschr.Röntg.Nukl.Med. 106, 569 (1968)
3. PICKARDT, C.R., K.HORN und P.C.SCRIBA: Moderne Aspekte der Schilddrüsendiagnostik. Der Internist 13, 133 (1972)
4. SURKS, M.L., A.R.SCHADLOW and J.H.OPPENHEIMER: A New Radioimmunoassay for Plasma L-Triiodothyronine: Measurements in Thyroid Disease and in Patients maintained on Hormonal Replacement. The Journal of Clinical Invest. 51, 3104 (1972)
5. GHARIB, H., R.J.RYAN, W.E.MAYBERRY and T.HOCKERT: Radioimmunoassay for Triiodothyronine (T_3). J.clin.Endocr. 33, 509 (1971)
6. MITSUMA, T., N.NIHEI, J.COLUCCI, C.THAW, H.NADEL, M.C.GERSHENGORN and C.S.HOLLANDER: Rapid simultaneous Radioimmunoassay for Triiodothyronine and Thyroxine in Unextracted Serum. J.clin.Invest. 50, 2679 (1971)

7. CHOPRA, I.J., J.C.NELSON, D.H.SOLOMON and G.N.BEALL:
Production of Antibodies Specifically Binding Triiodothyronine and Thyroxine.
J.clin.Endocr., Springfield 32, 299 (1971)
8. MITSUMA, T., J.COLUCCI, L.SHENKMAN and C.S.HOLLANDER:
Rapid Simultaneous Radioimmunoassay for Triiodothyronine und Thyroxine in Unextracted Serum.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 46, 2107 (1972)
9. HESCH, R.D. and D.EVERED: Radioimmunoassay of Triiodothyronine in Unextracted Human Serum.
British Med.Journ. 1, 645 (1973)
10. LIEBLICH, J. and R.D.UTIGER: Triiodothyronine Radioimmunoassay.
J.clin.Invest. 51, 157 (1972)
11. HESCH, R.D., M.HÜFNER und A.von zur MÜHLEN: Erste klinische Ergebnisse mit einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode von Trijodthyronin im Plasma.
Dtsch.Med.Wochenschr. 97, 351 (1972)
12. BURGER, A., B.MILLER, C.SAKOLOW and M.B.VALLOTTON: Serum Triiodothyronine Determination by Saturation Analysis.
Acta endocr. 72, 714 (1973)
13. NAUMAN, J.A., A.NAUMAN and S.C.WERNER: Total and Free Triiodothyronine in Human Serum.
J.clin.Invest. 46, 1346 (1967)

14. STERLING, K., D. BELLABARBA, E. S. NEWMAN and M. A. BRENNER:
Determination of Triiodothyronine
concentration in human serum.
J.clin.Invest. 48, 1150 (1969)
15. RADICHEVICH, I. and S. C. WERNER: No Interference from
Thyroxine Methyl Ester with T_3 De-
termination by Nauman, Nauman and
Werner Method.
J.clin.Endocr. 32, 350 (1971)
16. WAHNER, H. W. and C. A. GORMAN: Interpretation of Serum
Triiodothyronine Levels measured by
the Sterling Technic.
N.Engl.J.Med. 284, 225 (1971)
17. LARSEN, P. R.: Technical Aspects of the Estimation
of Triiodothyronine in Human Serum:
Evidence of Conversion of Thyroxine
to Triiodothyronine during Assay.
Metabolism 20, 609 (1971)
18. FISHER, D. A. and J. H. DUSSAULT: Contribution of Metho-
dological Artifacts to the Measure-
ment of T_3 Concentration in Serum.
J.clin.Endocr. 32, 675 (1971)
19. HOLLANDER, C. S. On the nature of circulating thyroid
hormone: Clinical studies of triiodo-
thyronine and thyroxine in serum
using gas chromatographic methods.
Trans.Ass.Amer.Physicians 81, 76 (1968)
20. HORN, K., T. RUHL and P. C. SCRIBA: Semiautomatic Method for
the Separation and Determination of
Total Triiodothyronine and Thyroxine
in Serum.
Z.klin.Chem. 10, 99 (1972)

21. RUHL, T.: Serumspiegel von Trijodthyronin und Thyroxin: Ein säulenchromatographisches Trennverfahren mit chemischem Jodnachweis.
Dissertation, Univ.München (1973)
22. SCHREIBER, B.E., H.M.ORTNER, G.LEB und O.EBER: Klinische Beurteilung einer neuen Methode zur Bestimmung des Serum-Trijodthyronins.
Acta endocr. 70, 252 (1972)
23. DUSSAULT, J.H., R.LAM and D.A.FISHÉR: The Measurement of Serum Triiodothyronine by Double Column Chromatography.
J.Lab.Clin.Med. 6, 1039 (1971)
24. HABERMANN, J.: Quantitative Bestimmung von Schilddrüsenhormonen mit der competitiven Proteinbindungsanalyse.
Dissertation, Univ.München (1973)
25. THE CHEMICAL RUBBER PUBLISHING CO., CLEVELAND, OHIO (USA):
Handbook of Chemistry and Physics
44th Edition 1962 - 63
26. KOERNER, D., M.I.SURKS and J.H.OPPENHEIMER: In Vitro Formation of Apparent Covalent Complexes between L-Triiodothyronine and Plasma Protein.
JCE & M. 36, 239 (1973)
27. GORDON, A. and T.COUTSOFTIDES: Thyroxine binding proteins of human serum at physiological pH.
Act.Endocr. 62, 217 (1969)

28. DAVIS, P.J., B.S. HANDWERGER and R.I. GREGERMANN:
Thyroid Hormone Binding by Human
Serum Prealbumin (TBPA).
J. of clin. Invest. 51, 515 (1972)
29. STERLING, K.: Molecular structure of thyroxine in
relation to its binding by human
serum albumin.
J. clin. Invest. 43, 1721 (1964)
30. TABACHNICK, M. and N.A. GIORGIO Jr.: Thyroxine protein
interactions. II. The binding of
thyroxine and its analogues to human
serum albumin.
Arch. Biochem. Biophys. 105, 563 (1964)
31. DORFNER, K.: Ionenaustauscher. Eigenschaften und
Anwendungen. Zweite Auflage.
Walter de Gruyter & Co., Berlin (1964)
32. HALLHUBER, G.: Ein säulenchromatographisches Verfah-
ren zur Auftrennung der Jodaminosäu-
ren im Serum unter besonderer Berück-
sichtigung der Trennung von Trijod-
thyronin und Thyroxin.
Dissertation, Univ. München (1970)
33. PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, UPPSALA/SCHWEDEN: Leitfa-
den zur Ionenaustauschchromatographie
(1966)
34. STUMPF, W. und E.H. GRAUL: In vitro-Bestimmung der Schild-
drüsenfunktion mit dem Serum-T₃-Test.
Med. Klin. 58, 192 (1963)

35. HORN, K., R. LANDGRAF, T. RUHL und P. C. SCRIBA: Verbesserte mikrochemische Jodbestimmung von Schilddrüsenhormonen.
Z. Anal. Chem. 252, 267 (1969)
36. WEYGAND, C. Organisch-chemische Experimentierkunst.
Leipzig: Joh. Ambr. Barth 1938
37. SANDELL, E. R. and I. M. KOLTHOFF: Microdetermination of Iodine by a Catalytic Method.
Mikrochim. Acta 1, 9 (1937)
38. DUBRAVCIC, M.: Determination of Iodine in Natural Waters.
Analyst 80, 146 (1955)
39. MALKIN, H. M.: An Ultramicro PBI Method on Capillary Blood.
J. clin. Endocr. 25, 28 (1965)

L E B E N S L A U F

Am 19.1.1948 wurde ich als Sohn des Juweliers Hans Borowzak und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Benner, in Schellweiler geboren.

Ab April 1954 besuchte ich die Volksschule in Schellweiler, ab September 1955 die Volksschule in Kusel. Im April 1958 trat ich in das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium Kusel ein und legte hier im Oktober 1966 die Reifeprüfung ab.

Nach einem Semester Mathematik in Mainz und 13 Monaten Bundeswehr begann ich im Mai 1968 das Medizinstudium in München, wo ich 1969 das Vorphysikum und 1970 das Physikum bestand. Im Herbst 1973 werde ich in München das Medizinische Staatsexamen ablegen. Seit April 1973 bin ich mit der Lehrerin Helga Kostron verheiratet.

